

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/18, 16/46, C12N 5/20, A61K 39/00, 39/395, G01N 33/68, 33/577		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/31709 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Juli 1998 (23.07.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/07241 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1997 (22.12.97) (30) Prioritätsdaten: 197 01 607.3 17. Januar 1997 (17.01.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Brünigstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERL, Martin [DE/DE]; Zur Steinritz 48, D-65527 Niedermhausen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, JP, KR, MX, PL, RU, TR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: ANTIBODIES THAT BIND TO THE NIDOGEN-BINDING DOMAIN OF LAMININ, THEIR PRODUCTION AND USE (54) Bezeichnung: ANTIKÖRPER, DIE AN DIE NIDOGEN-BINDUNGSDOMÄNE DES LAMININS BINDEN, DEREN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG (57) Abstract <p>Monoclonal and polyclonal antibodies are disclosed as well as parts thereof which bind specifically to the nidogen-binding domain of laminin, as well as a process for producing the same and their use as medicaments, as diagnostic agents for detecting laminin isoforms and as model substances for developing and evaluating substances that influence the nidogen-laminin interaction. The disclosed antibodies or their parts bind preferably to the γ1 III 4-domain of laminin, in particular in the highly preserved area of loops a and c, and can inhibit the association of laminin and nidogen.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft monoklonale und polyklonale Antikörper sowie deren Teile, die spezifisch an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins binden, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung als Arzneimittel, als Diagnostikum zum Nachweis von Laminin-Isoformen und als Modellsubstanz zur Entwicklung und Bewertung von die Nidogen/Laminin-Interaktion beeinflussenden Stoffen. Die erfindungsgemäßen Antikörper oder deren Teile binden bevorzugt an der γ1 III 4-Domäne des Laminins, insbesondere im hochkonservierten Bereich der Loops a und c, und können die Assoziation von Laminin und Nidogen inhibieren.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Antikörper, die an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins binden, deren Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft monoklonale und polyklonale Antikörper sowie deren Teile, die spezifisch an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins binden, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung als Arzneimittel, als Diagnostikum zum Nachweis von Laminin-Isoformen und als Modellschubstanz zur Entwicklung und Bewertung von die Nidogen/Laminin-Interaktion beeinflussenden Stoffen. Die erfindungsgemäßen Antikörper oder deren Teile binden bevorzugt an der $\gamma 1$ III 4-Domäne des Laminins, insbesondere an wesentliche Nidogen-Bindungsstellen im hochkonservierten Bereich des Loops a bzw. der Loops a und c, und können die Assoziation von Laminin und Nidogen inhibieren.

Die Assoziation von Laminin (ein 800 kDa Glycoprotein) und Nidogen (ein 160 kDa Glycoprotein) wird als ein entscheidender biomolekularer Mechanismus bei der Synthese und Stabilisierung von Basalmembranen betrachtet (Mayer, U. & Timpl, R. (1994) in: Extracellular Matrix Assembly and Structure (Ed.: P.D. Yurchenco et al.) S. 389 - 416, Academic Press, Orlando, FL). Durch die Fähigkeit des Nidogens mit allen Hauptbestandteilen der Basalmembran wie z.B. $\gamma 1$ enthaltenden Laminin-Isoformen (zur Nomenklatur siehe: Burgeson, R.E. et al. (1994) Matrix Biology 14:209 - 211), Kollagen IV, Perlecan und Fibulin sowie deren jeweiligen Assoziationsstrukturen ternäre Komplexe auszubilden, übernimmt es die Funktion eines Bindegliedes, welches die voneinander unterschiedlichen Makrostrukturen miteinander verbindet, räumlich organisiert und stabilisiert (Fox, J.W. et al. (1991) EMBO J. 10:3137 - 3146; Aumailley, M. et al. (1993) Kidney Int. 43:7 - 12).

Einen deutlichen Hinweis auf die zentrale Funktion der Laminin/ Nidogen-Interaktion bei der Synthese einer funktionalen Basalmembran konnten Experimente mit polyklonalen Anti-Laminin-Antikörpern liefern. Die beschriebenen Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Laminin P1 oder dem rekombinant

erzeugten Lamininfragment $\gamma 1$ III 3-5 gewonnen und über eine Affinitätschromatographie an Laminin P1 oder Laminin $\gamma 1$ III 3-5-Matrices angereichert. Sie zeigten in Inhibitionstests eine komplette Hemmung der Laminin/Nidogen-Assoziation. Diese basiert aber auf einer sterischen Blockade des Nidogenzugangs zum Laminin durch die Antikörper, deren Bindungsregionen nur in der Nähe der nidogenbindenden Sequenzen des Laminins liegen (Mayer, U. et al. (1993) EMBO J. 12:1879 - 1885). In embryonalen Organkulturen konnten die beschriebenen Antikörper sowohl die Genese von Nierentubuli, als auch die Ausbildung von Lungenbläschen inhibieren. Beides sind Ontogeneseprogramme die von einer ungehinderten Neusynthese einer Basalmembran abhängen (Ekblom, P. et al. (1994) Development 120:2003 - 2014; Ekblom, P. (1993) in: Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes (Ed.: Rohrbach, D.H. & Timpl, R.) S. 359 - 383; Academic Press, San Diego, CA.).

Die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins konnte in ihrer Lokalisation, Sequenz und in ihrer räumlichen Struktur (Röntgenkristallstruktur und NMR-Struktur) eindeutig identifiziert und charakterisiert werden (Mayer, U. et al. (1993) EMBO J. 12:1879 - 1885; Baumgartner, R. et al. (1996) J. Mol. Biol. 257:658 - 668; Stetefeld, J. et al. (1996) J. Mol. Biol. 257:644 - 657). Sie befindet sich in einem "LE Modul" (laminin-type epidermal growth factor-like) des kurzen Arms der $\gamma 1$ - Kette des Laminins, in der Domäne $\gamma 1$ III 4. "LE Module" sind Strukturmodule aus 50 - 60 Aminosäuren die ein komplexes, zum "epidermal growth factor" analoges Faltungsmuster mit 4 Disulfidbrücken aufweisen (Bairoch, A. (1995) Nomenclature of extracellular domains. The SWISS-PROT Protein sequence data bank. release 310; Engel, J. (1989) FEBS Letters 251:1 - 7).

Eine hochaffine Bindung des Nidogens zur komplementären Laminin-Domäne konnte für Laminin P1 aus dem EHS Tumor der Maus, Laminin-2 und Laminin-4 aus humaner Plazenta und Laminin aus Drosophila nachgewiesen werden. Ursache für diese spezieübergreifende Bindungsspezifität ist die außerordentlich hohe Aminosäuresequenzidentität, die in der Laminin $\gamma 1$ III 4-Domäne bei den

untersuchten Spezies vorliegt. Sie beträgt 97% zwischen Mensch und Maus und erstaunliche 61 % zwischen Mensch und Drosophila, wenn das ganze Modul berücksichtigt wird. Beschränkt man den Vergleich auf den Bereich der loops a bis c, die wesentliche Nidogen-Bindungsstellen enthalten, dann erhöhen sich die Werte auf 100% bzw. 75% (Pikkarinen, T. et al. (1987) J. Biol. Chem. 263:6751 - 6758; Chi, H.-C. & Hui, C.-F. (1989) J. Biol. Chem. 264:1543 - 1550).

Neben der Abhängigkeit der Nidogen-Bindung von einer intakten dreidimensionalen Struktur, konnten eindeutige Sequenzbereiche identifiziert werden, die sich in den S-S stabilisierten loops a und c der Laminin-Domäne $\gamma 1$ III 4 befinden. Fünf essentielle Aminosäuren wurden identifiziert: Vier befinden sich innerhalb eines Abschnitts aus 7 Aminosäuren im loop a und eine Tyrosinseitenkette im loop c (Pöschl, E. et al. (1994) EMBO J. 13:3741 - 3747; Mayer, U. et al. (1993) EMBO J. 12:1879 - 1885; Pöschl, E. et al. (1996) EMBO J. 15:5154 - 5159).

Synthetische Peptide, die aus den entsprechenden Bereichen der Laminin-Domäne $\gamma 1$ III 4 abgeleitet werden können, sind in der Lage die Laminin/Nidogen-Bindung in speziellen Bindungsassays komplett zu inhibieren (US 5,493,008). Allerdings zeigen derartige synthetische Peptide in Inhibitionsassays eine Aktivität, die etwa 400- bzw. 10000-fach schwächer ist als die des intakten Laminin P1 oder Laminin $\gamma 1$ III 3-5 (Pöschl, E. et al. (1994) EMBO J. 13:3741 - 3747; US 5,493,008). Die Laminin/Nidogen-Interaktion ist durch eine starke konformationelle Komponente beeinflusst (Mayer, U. et al. (1993) EMBO J. 12:1879 - 1885). Die schwächere inhibitorische Wirkung der synthetischen Peptide ist erklärbar, da Peptide in wässriger Lösung eine Myriade von unterschiedlichen Konformationen einnehmen können und deshalb nur ein gewisser Prozentsatz der Peptide in der biologisch aktiven Konformation anzutreffen ist.

Die Verwendung solcher Peptide als Medikament ist daher aufgrund ihrer konformationellen Flexibilität, aber auch wegen ihrer Instabilität gegenüber Proteasen sowie ihrer schlechten Bioverfügbarkeit und Pharmakodynamik erheblich limitiert (Milner-White, E.J. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10:70 - 74; Hruby, V.J.

(1994) in: Peptides, Proc. Thirteenth American Peptide Symposium; (Ed.: Hodges, R.S. & Smith, J.A.) S. 3 - 17; ESCOM: Leiden, Netherlands).

Antikörper, die spezifisch an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins binden und die Assoziation zwischen Laminin und Nidogen bei geringer Konzentration kompetitiv zu inhibieren vermögen, sind aufgrund ihrer höheren Affinität und Avidität, ihrer hohen Stabilität sowie ihrer guten Pharmakokinetik besser als Therapeutikum zur Behandlung von Krankheiten geeignet. Weiterhin können sie als Diagnostikum oder als Hilfsmittel in biologischen und pharmakologischen Modellen zur Entwicklung und Bewertung von die Laminin/Nidogen-Interaktion beeinflussenden Stoffen eingesetzt werden.

Die bisher erzeugten Anti-Laminin P1- oder Anti-Laminin $\gamma 1$ III 3-5-Antikörper können zwar zum Teil die Nidogen/Laminin-Bindung inhibieren. Sie erkennen jedoch die Nidogen-Bindungsstellen der Laminin $\gamma 1$ -Kette nicht direkt, sondern die Inhibition der Nidogen/Laminin-Bindung erfolgt über sterische Wechselwirkung (Mayer, U. et al. (1993) EMBO J. 12:1879 - 1885). Die Nidogen-Bindungsdomäne der Laminin $\gamma 1$ -Kette ist spezieübergreifend außerordentlich stark konserviert. Darüber hinaus ist Laminin ein extrazelluläres Protein, das sowohl als integrierter Bestandteil von Basalmembranen, als auch in Form einer zirkulierenden Serumkomponente (EP 0 696 597 A2) ständig mit dem Immunsystem in Kontakt steht. Aufgrund der Fähigkeit des Immunsystems, "selbst" von "nicht-selbst" zu unterscheiden, muß gefolgert werden, daß jede immunisierte Spezies das hoch konservierte Immunisierungsantigen als eigenen Körperbestandteil erkennt und daher keine Antikörper gegen diesen entwickelt. Die Erzeugung eines spezifischen Antikörpertiters konnte deshalb nicht erwartet werden. Bestätigung fand diese allgemein anerkannte Lehrmeinung durch die Tatsache, daß durch Immunisierung von Kaninchen mit Laminin P1 und Laminin $\gamma 1$ III 3-5 bisher keine Antikörper gegen die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins erzeugt werden konnten (Mayer, U. et al. (1993) EMBO J. 12:1879 - 1885). Die oben beschriebenen polyklonalen Antikörper, die an nicht genau definierte Epitope außerhalb der Nidogen-

Bindungsdomäne des Laminins binden, sind jedoch als Therapeutikum, als Diagnostikum bzw. als Modellsubstanz zur Entwicklung und Bewertung von die Nidogen/Laminin-Interaktion beeinflussenden Stoffen nur sehr eingeschränkt bzw. überhaupt nicht geeignet: Die sterische Inhibition ist abhängig von der räumlichen Ausdehnung des Hemmstoffs, so daß der aus pharmakologischen Gründen bevorzugte Einsatz von Teilen dieser Antikörper als Therapeutikum kaum möglich ist. Des weiteren schränken mögliche Kreuzreaktionen mit nicht-nachzuweisenden Analyten die Verwendung dieser Antikörper in diagnostischen Testen ein

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Antikörper zu erzeugen, die spezifisch an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins binden, also die Nidogen-Bindungsdomäne der Laminin- $\gamma 1$ -Kette direkt erkennen, und die als Arzneimittel, als Diagnostikum zum Nachweis von Laminin-Isoformen sowie als Modellsubstanz zur Entwicklung und Bewertung von die Nidogen/Laminin-Interaktion beeinflussenden Stoffen geeignet sind.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst, durch die im folgenden beschriebenen Antikörper sowie die Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung.

Die erfindungsgemäßen Antikörper oder Teile davon sind dadurch gekennzeichnet, daß sie an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins, die Laminin $\gamma 1$ III 4-Domäne, bevorzugt an den hochkonservierten Bereich des Loops a bzw. der Loops a und c der Laminin $\gamma 1$ III 4-Domäne binden. Besonders bevorzugt binden die erfindungsgemäßen Antikörper in bezug auf das Epitop konformationsabhängig (d.h. die Nidogenbindungsstelle des Laminins in deren nativen Konformation erkennend; vgl. Beispiel 6) direkt oder überlappend an den hochkonservierten Bereich des Loops a bzw. der Loops a und c. Insbesondere werden von der Erfindung Antikörper oder Teile davon miteingeschlossen, die mindestens an ein Peptid gemäß Tabelle 1 binden. Die vorliegende Erfindung stellt sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper bereit. Die Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung sind bevorzugt chimäre, humanisierte, bi- oder oligospezifische

Antikörper. Besonders bevorzugt wird die Laminin-Nidogen-Bindung durch die Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung kompetitiv oder partiell kompetitiv inhibiert (vgl. Beispiel 7).

Tabelle 1: Aminosäuresequenz der zu Immunisierung verwendeten Peptide

- | | |
|------|--|
| (1): | DNIDPNAVGNL |
| (2) | DNIDPNAVGNLKCIYNTAGFYCDR (S-S verbrückte Form) |

|_____|

Die erfindungsgemäßen Antikörper sind erhältlich durch die Immunisierung immunkompetenter Wirbeltiere, wie z.B. Kaninchen, Mäuse, Schafe, Ziegen, Meerschweinchen, Ratten und Hühner mit Laminin, Laminin P1, Laminin γ 1 III-3-5, Laminin γ 1 III-4 sowie insbesondere mit Peptiden, die wesentliche Nidogen-Bindungsstellen enthalten aber nicht die vollständige Aminosäuresequenz der γ 1 III-4-Domäne des Laminins, ganz besonders bevorzugt eines der oder beide Peptide gemäß Tabelle 1, als Immunisierungsantigen.

Im Falle der Immunisierung mit Laminin bzw. Laminin P1 wird der Antikörper mittels Laminin γ 1 III-3-5 und/oder Laminin γ 1 III-4 identifiziert und schließlich auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft.

Im Falle der Immunisierung mit Laminin γ 1 III-3-5 wird der Antikörper mittels Laminin und/oder Laminin P1 identifiziert und schließlich auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft.

Besonders bevorzugt werden als Immunisierungsantigen Laminin γ 1 III-4 oder eines oder mehrere Peptide gemäß Tabelle 1 eingesetzt. Die durch die Immunisierung mittels dieser Immunisierungsantigene erhältlichen Antikörper werden vorzugsweise mittels Laminin und/oder Laminin P1 identifiziert. Vorteilhafterweise werden die

identifizierten Antikörper auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Bindungsstelle geprüft.

Neben polyklonalen Antikörpern sind auch monoklonale Antikörper (MAK) erhältlich, wobei bei letzteren zunächst MAK-produzierende Hybridoma-Zellen erzeugt werden. Die Antikörper sind auch in gereinigter Form erhältlich, indem die erfindungsgemäßen Antikörper aus Antikörper-enthaltendem Material, wie z.B. Antiserum des immunisierten Tieres, Hybridoma-Zellkulturüberstand, Aszites oder Zellen, beispielsweise durch Affinitätschromatographie, vorzugsweise an Laminin und/oder Laminin P1 als Affinitätsmatrix, gereinigt werden.

Die erfindungsgemäßen Antikörper oder Teile davon können die Laminin/Nidogen-Interaktion inhibieren und umfassen als Überbegriff auch die an anderer Stelle näher beschriebenen entsprechenden chimären, humanisierten, bi- oder oligospezifischen Antikörper sowie Antikörperanaloga.

Die Erfindung beinhaltet auch tierische, pflanzliche und prokaryontische Zellen sowie Zelllinien, die die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperteile produzieren, vorzugsweise das Hybridon DSMACC 2327, welches am 27. Oktober 1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Marscheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, DE) gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrags hinterlegt wurde. Die vorliegende Erfindung betrifft auch den von dem unter der Hinterlegungsnummer DSMACC 2327 hinterlegten Hybridom produzierten monoklonalen Antikörper.

Ferner umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen Antikörper, wobei immunkompetente Wirbeltiere, wie z.B. Kaninchen, Mäuse, Schafe, Ziegen, Meerschweinchen, Ratten und Hühner, mit Laminin, Laminin P1, Laminin γ 1 III 3-5 sowie Laminin γ 1 III 4, besonders bevorzugt Peptide, die nicht die vollständige Aminosäuresequenz der γ 1 III 4-Domäne des Laminins enthalten, ganz besonders bevorzugt eines der oder beide Peptide gemäß Tabelle 1. Unter dem

Begriff "Peptide" sind Oligopeptide, Polypeptide sowie Proteine und Proteinfragmente zu verstehen. Die als Immunisierungsantigen verwendeten Peptide werden bevorzugt gekoppelt an Träger wie beispielsweise Proteine, z.B. Ovalbumin, Albumin oder Hämocyanin, oder Polymere, z.B. Polyethylenglykol, Polyacrylamid oder Poly-d-Glutamin-d-Lysin, eingesetzt.

Im Falle der Immunisierung mit Laminin oder Laminin P1 wird der Antikörper mittels Laminin γ 1 III-3-5 und/oder Laminin γ 1 III-4 identifiziert und auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft.

Im Falle der Immunisierung mit Laminin γ 1 III-3-5 wird der Antikörper mittels Laminin und/oder Laminin P1 identifiziert und auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft.

Vorzugsweise wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Laminin γ 1 III-4 oder wahlweise eines der oder beide Peptide gemäß Tabelle 1 als Immunisierungsantigen eingesetzt, welches vorzugsweise an einen Träger gekoppelt ist.

Der durch Immunisierung mit Laminin γ 1 III-4 oder mit einem der oder beiden Peptiden gemäß Tabelle 1 erzeugte Antikörper wird vorzugsweise mittels Laminin und/oder Laminin P1 identifiziert und vorteilhafterweise auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft.

Optional beinhaltet das Verfahren auch die Erzeugung von MAK-produzierenden Hybridoma-Zellen. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die erfindungsgemäßen Antikörper oder deren Teile aus Antikörper enthaltendem Material, wie z.B. Antiserum des immunisierten Tieres, Hybridoma-Zellkulturüberstand, Aszites oder Zellen beispielsweise mit Hilfe der Affinitätschromatographie zu reinigen, wobei bevorzugt eine Laminin und/oder Laminin P1-Affinitätsmatrix verwendet wird.

Die erfindungsgemäßen Antikörper oder Teile davon können vielfältig verwendet werden, z.B. als Arzneimittel, als Diagnostikum, als Hilfsmittel in biologischen und pharmakologischen Modellen zur Entwicklung und Bewertung von die Laminin/Nidogen-Interaktion beeinflussenden Stoffen, z.B. als Modells substanz zur Evaluierung der räumlichen Struktur der zur Nidogen-Bindungsstelle des Laminins komplementären Kontaktzone und deren potentieller Bindungsvalenzen, sowie zur Untersuchung der Biosynthese von Basalmembranen und des Einflusses von Basalmembranen bei unterschiedlichen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Organentwicklung, Angiogenese oder Embryogenese. Die Erfindung schließt auch Arzneimittel und Diagnostika mit ein, die einen oder mehrere der erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperteile enthalten.

Ferner umfaßt ist die Verwendung von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Antikörpern oder Antikörperteilen

- * zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten, die durch eine vermehrte oder unerwünschte Synthese von Basalmembranen charakterisiert sind, insbesondere von Fibrosen, vor allem die alkoholische Leberfibrose sowie die Lungenfibrose, sowie alle Formen von diabetischen Spätkomplikationen, die von Verdickungen der Basalmembran begleitet sind - vor allem in Niere, Auge und Gefäßsystem -, sowie die Arteriosklerose und alle Krankheiten, bei denen eine Angiogenese zur Verschlechterung des klinischen Bildes beiträgt, z.B. Krebserkrankungen, diabetische Retinopathie und Erkrankungen mit einer starken entzündlichen Komponente wie z.B. rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, Vaskulitis, Haemangiome und Psoriasis;
- * zur Herstellung eines Diagnostikums zum Nachweis von γ 1-enthaltenen Lamininisoformen in biologischen Proben, z.B. in Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Speichel oder Liquor, sowie in Geweben. Unter den Begriff Diagnostikum fallen z.B. die verschiedenen Ausführungsformen heterogener und homogener Immunoassays, Testsysteme in der Immunhistochemie sowie auch

Reagenzien für in vivo Nachweisverfahren wie z.B. der Immunszintigraphie. Die die erfindungsgemäßen Antikörper oder Antikörperteile enthaltenden Zubereitungen können auch alleine oder zusammen mit weiteren Hilfsreagenzien, wie z.B. Puffer, Waschlösungen, Meßsignal-auslösenden Lösungen, und/oder anderen Hilfsmitteln, wie z.B. Küvetten, in Form von Diagnostika-Kits zusammengefaßt werden.

Im folgenden wird die Erfindung näher beschrieben und anhand diverser Beispiele im Detail erläutert:

Überraschenderweise konnte mit den in Tabelle 1 aufgeführten Peptiden, die kein Faltungsmuster auszubilden vermögen wie es in LE-Modulen vorliegt, Antikörper gegen die hochkonservierte Aminosäuresequenz der Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins erzeugt werden. Hierzu wurden die Peptide gemäß Tabelle 1 mit Hilfe von Carbodiimid an Ovalbumin gekoppelt und diese Konjugate zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Entwicklung eines spezifischen Antikörper-Titers gegen Laminin P1 und Laminin $\gamma 1$ III 3-5 wurde mit Hilfe eines Enzymimmunoassays analysiert.

Die polyklonalen Antikörper gewünschter Spezifität wurden dann per Affinitätschromatographie über eine Matrix, an die Laminin P1 aus humaner Plazenta gebunden war, und anschließender Siebgelchromatographie angereichert. Die Methoden zur Reinigung und Charakterisierung von Laminin aus humaner Plazenta sowie dessen Verwendung zur Immunisierung von Mäusen und zur Gewinnung von Anti-Laminin P1-Antikörper synthetisierenden Hybridomen sind in der EP 0 696 597 A2 beschrieben.

Die nach Laminin P1-Affinitätschromatographie des Antiserums angereicherten Antikörper zeigen eine Bindungsspezifität gegenüber Laminin P1 aus der Humanplazenta, Laminin P1 aus der Maus (EHS Tumor) und Laminin aus der Ratte (Dottersack). Die Antikörper erkennen nicht nur die spezifische Sequenz sondern

auch die biologisch aktive Konformation der Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins. Sie sind in der Lage, die Laminin/Nidogen-Bindung komplett zu inhibieren. Die erfindungsgemäßen Antikörper sind aber auch erhältlich durch die Immunisierung anderer immunkompetenter Wirbeltiere, wie z.B. Mäuse, Schafe, Ziegen, Meerschweinchen, Ratten u. Hühner, bevorzugt mit Laminin $\gamma 1$ III 4 sowie insbesondere mit Peptiden, die wesentliche Nidogen-Bindungsstellen enthalten aber nicht die vollständige Aminosäuresequenz der $\gamma 1$ III 4-Domäne des Laminins, ganz besonders bevorzugt die Peptide gemäß Tabelle 1. Erfindungsgemäße polyklonale Antikörper können aus dem Antiserum der immunisierten Tiere gereinigt werden. Um entsprechende monoklonale Antikörper zu erzeugen, werden nach allgemein bekannten Verfahren (siehe z.B. Harlow, E. & Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor) die Immunzellen immunisierter Tiere, wie z.B. Mäuse, mit Myelomzellen zum Erzeugen von MAK-produzierenden Hybridoma-Zellen verschmolzen und anschließend geeignete Klone isoliert. Die Auswahl der die gewünschten MAK-produzierenden Klone wird mit Hilfe spezifischer Screeningverfahren durchgeführt. Hierbei wird die Bindungsspezifität der in den Kulturüberstand abgegebenen Antikörper z.B. an das Immunisierungsantigen, an den Träger des Immunisierungsantigens, an natives wie rekombinantes Laminin bzw. an dessen Fragmente bevorzugt mittels Enzym- oder Radioimmunoassays sowie Western Blots überprüft. Ein weiteres mögliches Selektionskriterium ist die Fähigkeit der Antikörper, die Nidogen/Laminin-Bindung zu verhindern. Diese kann z.B. mittels der in den Beispielen näher beschriebenen Inhibitionsassays bewertet werden. Hybridome, die spezifisch an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins bindende MAK herstellen, werden kloniert. Sie stehen sodann für die MAK-Produktion auf Dauer zur Verfügung. Je nach gewünschtem Verwendungszweck ist es vorteilhaft, nur Teile der Antikörper, wie z.B. $F(ab)_2$, Fab' oder Fab-Fragmente, einzusetzen. Diese können beispielsweise mit dem Fachmann bekannten enzymatischen Spaltverfahren (siehe z.B. Harlow, E. & Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor) erzeugt werden.

Die Antigenbindungsstellen eines Antikörpers befinden sich in den sogenannten variablen Domänen, die durch die entsprechenden V-Gene kodiert sind. Mit den bekannten gentechnischen Methoden (siehe z.B. Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2nd. edition; McCafferty, J. et al. (1990) *Nature* 348:552-554) kann auch die entsprechende Nukleinsäuresequenz eines an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins bindenden Antikörpers ermittelt werden sowie dadurch auch die entsprechende Aminosäuresequenz, sofern diese noch nicht per Aminosäuresequenzierung bereits bekannt war. Als Ausgangsmaterial für die Analysen werden Hybridoma-Zellen bzw. die Antikörper-produzierenden Immunzellen immunisierter Säugetiere eingesetzt.

In Kenntnis der Nuklein- und Aminosäuresequenz können mit Hilfe üblicher gentechnischer und molekularbiologischer Methoden (siehe auch Johnson, K.S. & Chiswell, D.J. (1993) *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571) dann humanisierte oder chimäre, bi- oder oligospezifische Antikörper sowie Antikörperanaloge, wie z.B. von der "complementarity determining region" abgeleiteten Polypeptide ("minimal recognition units"), "single chain"-Fragmente oder funktionelle Fusionsprodukte - wie insbesondere rekombinant hergestellte Antikörper-Enzym oder -Komplement-Konstrukte - hergestellt werden, die spezifisch an die Nidogen-Bindungsdomäne des Laminins binden. Diese vom erfindungsgemäßen Antikörper bzw. Antikörpergen abgeleiteten Moleküle werden von dem in dieser Schrift verwendeten Überbegriff "Antikörper oder ein Teil desselben" mitumfaßt. Mit diesen Molekülen kann z.B. eine Verringerung der Immunogenität und/oder eine verstärkte Wirksamkeit bei Verabreichung als Arzneimittel erzielt werden und/oder es ergeben sich Vorteile für den Einsatz als Diagnostikum bzw. als Hilfsmittel für die Entwicklung und Bewertung von die Laminin/Nidogen-Interaktion beeinflussenden Stoffen. Die Antikörper oder Teile derselben sind herstellbar in pflanzlichen (z.B. Hefe), tierischen und prokaryontischen Zellen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper sowie Teile derselben können modifiziert werden, z.B. durch die Markierung mit radioaktiven Isotopen oder paramagnetischen Verbindungen zum Einsatz für die in vivo-Diagnostik oder durch die Anbindung von pharmakologisch wirksamen Substanzen zur Erzeugung eines noch wirksameren Arzneimittels.

Die im folgenden aufgeführten Beispiele dienen zur exemplarischen Beleuchtung einzelner Aspekte der Erfindung.

Beispiele:

SDS-Gelelektrophorese, Western Blotting, BCA Proteinbestimmung wurden nach Standardprotokollen oder nach den Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Wenn nicht ausdrücklich angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder Riedel de Haën (Seelze) bezogen.

Beispiel 1: Synthese von Peptiden

148 mg (0,1 mmol) eines Fmoc-Amidanker-PAM Harzes wurden zur Festphasensynthese - ABI 433 Peptidsynthesizer - des Peptides eingesetzt. Nach Beendigung der Synthese beobachtete man eine Gewichtszunahme des Harzes auf 513 mg. Das Harz wurde mit einer Lösung aus 10 ml Trifluoressigsäure und 365 µl Triethylsilan für 2 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Nach Abfiltration des Harzes wurde die Lösung im Vakuum einrotiert und mit 50 ml 10% Essigsäure (AcOH) aufgenommen und gefriergetrocknet. Man erhielt 145 mg (54% Ausbeute) an Rohpeptid. Das Rohpeptid wurde anschließend in 3 ml 80% AcOH gelöst und diese Lösung zu einer schnell gerührten Lösung (0,006 mmol Jod, 0,006 mmol Natriumacetat in 55 ml 80% AcOH) zugetropft. Nach 5 min wurde die Reaktion durch

Zugabe von 0,1 N Ascorbinsäurelösung beendet. Die Lösung wurde auf ein Volumen von 2 ml eingeeengt und auf eine Sephadex® G25 Säule, die mit 0,1 M AcOH entwickelt wurde, aufgetragen. Das isolierte Peptid wurde durch Reversed Phase HPLC-Chromatographie hochgereinigt.

Ausbeute: 36 mg von DNIDPNAVGNLKCIYNTAGFYCDR-NH₂ (13,5% der Theorie.)

Die Struktur wurde durch Massenspektroskopie (Molmasse: 2673 Da) und Aminosäureanalyse bestätigt.

Analog wurde das Peptid DNIDPNAVGNL-NH₂ hergestellt.

Ausbeute: 268mg (67% der Theorie); Molmasse: 1140 Da

Beispiel 2: Kopplung der Peptide an Ovalbumin

30 mg Ovalbumin (Sigma A-2512) wurden in 1 ml Na-Phosphat Puffer, pH 7,4 gelöst und mit 200 µl einer wäßrigen Lösung aus 7 mg N-Hydroxysulfosuccinimid Na - Salz (Fluka 56485) sowie 300 µl einer wäßrigen Lösung aus 100 mg 1-Ethyl-3-(3-Diaminaminopropyl)-carbodiimid, HCl (Sigma E-6383) versetzt. Nach 5 Minuten wurde die Peptidlösung (30 mg des entsprechenden Peptids in 1 ml 10 mM Na-Phosphat Puffer, pH 7,4) zugegeben. Die Kopplungsreaktion verlief 16 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Reaktionszeit wurde die Lösung zentrifugiert, um eventuell auftretende Trübungen zu entfernen. Unreagierte Chemikalien und Salze wurden anschließend durch Chromatographie über eine NAP-25 Säule (Pharmacia) entfernt. Das Ovalbumin/Peptid Konjugat wurde dadurch in PBS + 0,04% Tween-20 überführt. Die Ausbeute betrug 50 - 55 mg Konjugat.

Konjugat-1: Ovalbumin-DNIDPNAVGNL

Konjugat-2: Ovalbumin-DNIDPNAVGNLKCIYNTAGFYCDR (S-S verbrückte Form)

| _____ |

Beispiel 3: Immunisierung von Kaninchen

Gemischtrassige Kaninchen mit einem Körpergewicht von ca. 3 kg wurden mit den Ovalbumin/Peptid Konjugaten immunisiert. Hierfür wurden 1 mg der entsprechenden Konjugate in 0,5 ml Phosphat-gepufferte Saline (PBS) gelöst und dann mit demselben Volumen komplettes Freund'sches Adjuvans gemischt und sorgfältig emulgiert. 1 ml der so erhaltenen Emulsion wurde einem Kaninchen intradermal injiziert; dabei wurde jeweils ein Fünftel des Volumens in fünf unterschiedliche Stellen, nahe der regionalen Lymphknoten, appliziert. Booster-Injektionen (das Antigen wurde hierfür mit unkompletten Freund'schem Adjuvans emulgiert) wurden mit halbkonzentrierter Antigenemulsion nach 21 Tagen und 53 Tagen durchgeführt.

Beispiel 4: Titerentwicklung in vier immunisierten Kaninchen

Die spezifische Antikörper-Titerentwicklung wurde bei vier Tieren mit einem Enzymimmunoassay unter Verwendung von Laminin P1 bzw. Laminin $\gamma 1$ III 3-5 beschichteten Kunststoffgefäßen näher untersucht. Die entsprechenden Tierseren sind mit den Bezeichnungen K2, K3, K4 und K905 spezifiziert. Die Seren K3 und K4 wurden durch Immunisierung mit Konjugat-1 erhalten, die Seren K2 und K905 durch Immunisierung mit Konjugat-2. In allen Kaninchen wurde sehr schnell eine Immunreaktion angeregt, die dann nach 21 Tagen (1. Booster) konstant blieb, bzw. langsam aber kontinuierlich abklang. Eine erneute Stimulierung der Immunantwort durch eine zweite Boosterinjektion wurde nicht beobachtet. Die gebildeten Antikörper reagierten sowohl mit Laminin P1 als auch mit der Laminin-Domäne $\gamma 1$ III 3-5. Die Bindung zum Laminin P1 war allerdings etwas weniger ausgeprägt als die zum Laminin $\gamma 1$ III 3-5 und schien im Prozeß der Immunreaktion stärkeren Schwankungen unterworfen zu sein. Dies kann ein Hinweis sein auf mehrere Antikörperpopulationen im polyklonalen Serum, die mit verschiedenen Affinitäten die Nidogen-bindenden Motive, bzw. deren Konformationen im Laminin P1 und im Laminin $\gamma 1$ III 3-5 binden.

Beispiel 5: Affinitätsreinigung der Antikörper

Zur weiteren Charakterisierung wurden die spezifischen Antikörper von den übrigen Immunglobulinen im Tierserum, weiteren Serumbestandteilen und den gegen Ovalbumin gerichteten Antikörpern abgetrennt. Hierfür wurde eine Affinitätschromatographie an einer Laminin P1-Affinitätsmatrix durchgeführt. Als Träger (Gelmatrix) wurde Fractogel® EMD Azlacton 650(S) (Merck, Darmstadt) verwendet. 0,3 g des Materials wurden vor der Kopplung 15 Minuten in 6 ml PBS, 1 M Na₂SO₃, pH 7,4 inkubiert, anschließend wurde der flüssige Überstand abgegossen. Während der Inkubation quoll das Material auf ein Volumen von 1 ml und die Matrix konnte direkt zur kovalenten Kopplung des gewünschten Liganden eingesetzt werden.

3,4 mg humanes Laminin P1 wurden in 2 ml 0,2 M Ammoniumbicarbonat, pH 8,0 gelöst und mit 1 ml aktiviertem (s.o.) Trägermaterial bei 4°C über Nacht (> 16 h) inkubiert. Anschließend wurde das Gelmaterial mit 0,2 M Ammoniumbicarbonat, pH 8,0 gewaschen. Die verbliebenen aktiven Gruppen des Trägermaterials wurden durch eine 24-stündige Inkubation in 5 ml 0,2 M Glyzin, pH 8,0 bei 4°C blockiert. Schließlich wurde die Gelmatrix mit drei Waschzyklen, bestehend aus alternierenden Inkubationen in PBS, 1 M Na₂SO₃, pH 7,4, 0,1 M Na-Azetat, pH 4,0 und 0,2 M Glyzin, pH 8,0 für die Affinitätsbindung vorbereitet. Die Matrix wurde in eine HR 5/5 Säule von Pharmacia gefüllt und mit PBS / 0,04% Tween-20 equilibriert.

Zur Reinigung Laminin P1 - bindender Antikörper aus den Tierseren wurde das jeweilige Serum 1:2 mit PBS / 0,04% Tween-20 verdünnt und bei einer Flußrate von 2 ml/min über die Säule geleitet. Anschließend wurde mit Puffer nachgewaschen bis im UV-Signal (220 nm) des Durchflußmonitors die Grundlinie wieder erreicht wurde. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte schließlich durch den Wechsel des Laufpuffers zu 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,7.

Die Analyse der Säulendurchläufe und Säuleneluatete erfolgte mit Hilfe eines Enzymimmunoassays unter Verwendung von immobilisiertem Laminin $\gamma 1$ III 3-5.

Aus den vier Tierseren konnten durch die beschriebene Affinitätsreinigung Antikörper gereinigt werden. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 0,3 mg pro 50 ml Serum (im Falle des Serums K2 betrug die Ausbeute lediglich 0,1 mg). Ein Großteil der Antikörper in allen Seren (> 80%) band allerdings nicht an Laminin P1, vermutlich aufgrund einer zu langsamen Bindungskinetik oder aufgrund einer ausschließlichen Affinität zur Sequenz des zur Immunisierung verwendeten Peptids.

Die Affinitätschromatographie an Laminin P1-Säulen führt folglich zu einer selektiven Anreicherung der schnell und stabil bindenden Antikörpervarianten (der gesuchten Antikörper) aus dem Serum.

Beispiel 6: Bindungsspezifitäten der affinitätsgereinigten Antikörper

Mittels Western Blot wurde nachgewiesen, daß die affinitätsgereinigten Antikörper ihre Bindungsspezifität zum Laminin P1 bewahrt haben und daß die verschiedenen Präparationen stärker mit dem nicht reduzierten Laminin P1 reagierten als mit den durch Reduktion der Disulfide separierbaren linearen Laminin P1-Fragmenten (Gerl, M. et al. (1991) Eur. J. Biochem. 202:167 - 174). Dies ist ein Indiz für eine konformationsabhängige Komponente in der Bindungsspezifität der Antikörper. Weiterhin zeigte sich, daß sich die vier Antikörperpräparationen in ihren Bindungspräferenzen voneinander unterschieden. Die beiden durch Immunisierung mit Konjugat-1 gewonnenen Antikörperpräparationen K3 und K4 erkannten identische Laminin P1-Banden nach SDS (Sodiumdodecylsulfat) Gelelektrophorese der nicht reduzierten Probe. Die beiden Antikörperpräparationen K2 und K 905 (Anti-Konjugat-2) zeigten ebenfalls ein zueinander identisches Reaktionsmuster, allerdings wurden weniger Laminin P1-Banden erkannt als bei den beiden Anti-Konjugat-1-Antikörperpräparationen.

Beim immunchemischen Nachweis der durch Reduktion und SDS-Gelelektrophorese separierten Laminin P1-Banden fällt auf, daß alle vier Antikörperpräparationen unterschiedliche Bindungspräferenzen zu Laminin $\gamma 1$ III 4 enthaltenden Fragmenten aufwiesen.

Beispiel 7: Inhibitionsassays - Hemmung der Laminin/Nidogen-Bindung mit affinitätsgereinigten Antikörpern

Die inhibitorische Aktivität der affinitätsgereinigten Antikörper kann mit einem "coated tube assay" identifiziert werden, in dem die Bindung von radioaktiv markiertem Nidogen an Laminin P1 (aus humaner Plazenta) beschichtete Röhrchen in Anwesenheit der Antikörper gemessen wird.

Radioaktive Markierung von Nidogen mit ^{125}Jod

Rekombinant produziertes humanes Nidogen (35 μg , Beschreibung des Klons, Kultur- und Reinigungsbedingungen, siehe Mayer, U. et al. (1995) Eur. J. Biochem. 227:681 - 686) wurde in 250 μl PBS gelöst und mit 0,405 mCi (= 15 MBq) Na-Jodid (^{125}I)Lösung (= 1,55 μl , Nordion Europe), 10 μl 0,5 M Na-Phosphat, pH 7,4 sowie 40 μg Chloramin T (N-Chlor-4-Toluolsulfonsäureamid Natriumsalz, Merck) in 100 μl 0,05 M Na-Phosphat, pH 7,4 versetzt. Die Reaktion erfolgte 60 Sekunden bei Raumtemperatur und wurde durch Zugabe einer Lösung von 40 μg Na-Meta-Bisulfit (Riedel-de-Haën) in 100 μl 0,05 M Na-Phosphat, pH 7,4 gestoppt. Dies erfolgte in maximal 30 Sekunden, dann wurde der Ansatz mit 900 μl 1% BSA (Sigma) in PBS versetzt. Die Abtrennung freier Radioaktivität und überschüssiger Salze erfolgte durch Siebgelchromatographie mit Hilfe einer PD 10 Säule (Pharmacia). Das in PBS eluierte jodierte Nidogen wurde gepoolt und so mit 1% BSA/0,05 M Na-Phosphat/0,01% Na-Azid, pH 7,4 verdünnt, daß eine Konzentration von 50 ng/ml resultierte.

Beschichtung von Reaktionsröhrchen

Reaktionsröhrchen (Greiner, 75 x 12, No. 115061) werden mit einer Laminin P1 Lösung, 4 µg/ml in Carbonat Puffer (0,159g Na₂CO₃; 0,293g NaHCO₃; 0,02g NaN₃ in 1 Liter destilliertem Wasser), 20 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin, Serva) pH 9,2 über Nacht bei 4°C beschichtet. Freie Bindungsstellen werden anschließend durch 2-stündige Inkubation mit 0,5 ml 0,5% BSA in PBS/0,04% Tween-20 blockiert.

Inhibitionsassay mit "lamininmimetischen" Strukturen (sequentielle Inhibition)

In einem Reaktionsgefäß wurden 200 µl jodiertes Nidogen (ca. 10 ng, ca. 40000 counts per min) und 200 µl des Inhibitors (z.B. Peptide, die aus der Domäne γ1 III 4 des Laminins abgeleitet werden können) oder Standards (Laminin γ1 III 3-5) bei Raumtemperatur geschüttelt. Sowohl der Inhibitor als auch der Standard waren in PBS/0,04% Tween-20 gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wurden 150 µl aus diesem Ansatz in die gecoateten Röhrchen überführt und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Lösung abgekippt, zweimal mit 1 ml PBS/0,04% Tween-20 gewaschen und die gebundene Radioaktivität (Nidogen) im Gamma-Counter gemessen. Die Menge an gebundenem Nidogen in den Lösungen mit Inhibitor wurde mit der des Nidogens ohne Inhibitorzusatz in Beziehung gesetzt.

Inhibitionsassay mit "nidogenmimetischen" Strukturen (sequentielle Inhibition)

In den mit Laminin P1 beschichteten Reaktionsgefäßen wurden 150 µl des Inhibitors (z.B. ein an die Domäne γ1 III 4 des Laminins bindender Antikörper oder ein Peptid, welches aus der Sequenz des Nidogens abgeleitet werden kann) oder Standards (rekombinantes Nidogen) für 3 Stunden geschüttelt. Sowohl Inhibitor als auch Standard waren in PBS/0,04% Tween-20 gelöst. Nach dem Absaugen der Probe wurde für 2 Stunden 150 µl jodiertes Nidogen (ca. 10 ng, ca. 40000 counts per min) zugegeben, um den gebundenen Inhibitor zu verdrängen. Schließlich wurde die Lösung abgekippt, zweimal mit 1 ml PBS/0,04% Tween-20 gewaschen und die

gebundene Radioaktivität (Nidogen) im Gamma-Counter gemessen. Die Menge an gebundenem radioaktiven Nidogen wurde mit der Inhibitor- bzw. Standardkonzentration in Beziehung gesetzt.

Inhibitionsassay (simultane Inhibition)

Bei dieser Assayvariante erfolgte keine Vorinkubation. Es wurden vielmehr 75 µl jodiertes Nidogen (10 ng) mit 75 µl Inhibitor oder Standard direkt in die gecoateten Röhrchen pipettiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, ansonsten wurde analog zu den sequentiellen Assayvarianten verfahren.

Ergebnis

Für den Standard Laminin γ 1 III 3-5 wurde aus zehn unabhängig durchgeführten Assays eine $IC_{50\%}$ von 0,22 nM mit einer Standardabweichung von $\pm 15\%$ ermittelt. Die $IC_{50\%}$ ist als die Stoffkonzentration definiert, die für eine 50%ige Hemmung der Nidogen-Bindung an Laminin P1 benötigt wird. Mit dem in US 5,493,008 beschriebenen (Equilibrium-) Inhibitionsassay wurde vergleichsweise ein $IC_{50\%}$ von 0,05 nM mit einer Standardabweichung von $\pm 52\%$ erhalten.

Der Tabelle 2 sind die $IC_{50\%}$ -Werte der Antikörperpräparationen K3, K905, K1.2, K2.2 und K3.2 sowie verschiedener freier Peptide zu entnehmen. Die Antikörperpräparationen K1.2, K2.2 und K3.2 stammen aus einer zweiten Immunisierungskampagne von Kaninchen mit neuem Konjugat-2 und vergleichbarer Aufreinigung. Die Ergebnisse belegen die Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Tabelle 2: Inhibition der Laminin/Nidogen-Bindung durch die erfindungsgemäßen Antikörper.

Inhibitor	K3	K905	K1.2	K2.2	K3.2	Peptid (1)*	Peptid (2)*
	IC _{50%} nM	IC _{50%} nM	IC _{50%} nM	IC _{50%} nM	IC _{50%} nM	IC _{50%} nM	IC _{50%} nM
sequentiell**	72	150	500	80	350	60000	20000
simultan**	110	-	600	80	500	60000	20000

*: Aminosäuresequenz s. Tabelle 1

** : Assaytyp

In US 5,493,008 werden für inhibitorische Peptide, die aus der Nidogen/Bindungsdomäne abgeleitet werden können, IC_{50%}-Werte zwischen 22 nM und 1000 nM angegeben. Diese Werte konnten mit dem gewählten Assay - aufgrund der drastisch verkürzten Inkubationszeiten - nicht erreicht werden; Das Peptid DNIDPNAVGNL erreichte im hier beschriebenen Assay z.B. nur einen IC_{50%} = 60000 nM.

Beispiel 8: Charakterisierung der Bindungskinetiken mit dem BIAcore® System

Mit dem BIAcore® System der Firma Pharmacia Biosensor können biospezifische Interaktionen on-line verfolgt werden. Das Prinzip der Messung beruht auf einem optischen Phänomen (surface plasmon resonance), das durch die auf einem Goldfilm gebundene Masse beeinflusst wird. Vereinfacht ausgedrückt handelt es sich um eine miniaturisierte Affinitätschromatographie auf einer Gold-Sensoroberfläche. Die Menge des spezifisch gebundenen Liganden kann in Form eines Resonanzsignals bildlich dargestellt werden (Chaiken, I. et al. (1992) Anal. Biochem. 201:197 - 201; Karlsson, R. et al. (1992) in: Structure of Antigens; (Ed.: van Regenmortel). S. 127 - 148; CRC Press, Boca Raton, FL.)

Laminin P1 wurde gemäß den Instruktionen des User-Manuals bei einer Konzentration von 200 µg/ml in 10 mM Na-Acetat, pH 4,0 auf dem Sensorchip immobilisiert. Es resultiert eine Matrix mit 4000 RU gebundenem Laminin P1. Zur Regeneration der Affinitätsmatrix kann ein Doppelimpuls à 4 µl 100 mM HCl durchgeführt werden.

Bei einer Flußrate von 2 µl/min in HBS Puffer (10 mM HEPES, 3,4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,005% BIA surfactant P20; pH = 7,4) band Nidogen (20 µg/ml) mit einer parabolischen Sättigungskinetik an Laminin P1, die affinitätsgereinigten Antikörperpräparationen K905 und K3 in einer linearen Abhängigkeit zum Antigen. Die Tatsache, daß nach 1400 Sekunden noch kein Übergang zur Gleichgewichtseinstellung zu beobachten war, kann Ausdruck dafür sein, daß die spezifische Peptidsequenz des Laminin P1, welche für die Nidogen-Bindung verantwortlich ist, für die Antikörper gut zugänglich war. Die Antikörper banden an diese Sequenz unabhängig davon, ob sie in der biologisch aktiven oder in einer davon unterschiedlichen Konformation vorlag. Beleg dafür ist die Beobachtung, daß das Nidogen bereits nach einer Bindung von 600 RU einen deutlichen Übergang in die Sättigungsphase aufwies. Es lagen also offensichtlich nicht alle immobilisierten Laminin P1 Moleküle in einer für das Nidogen erkennbaren Struktur vor, da die theoretische Maximalsättigung der Schicht von 2500 RU nicht erreicht wurde. Diese wäre aber von den beiden Antikörpern nach langer Kontaktzeit erreicht worden. Auffallend ist, daß die Probe K905 zehnfach höher konzentriert eingesetzt werden (320 µg/ml) mußte, um eine mit K3 (33 µg/ml) vergleichbare Bindungsrate zu erreichen. Die Bindung von K905 zum Laminin P1 war hingegen stabiler als die von K3, denn die Dissoziationsrate von K905 (erkennbar ab dem Zeitpunkt des Wechsels zum HBS Puffer: 1500 Sekunden) war erheblich langsamer als die der Präparation K3.

Diese Befunde erklären die in den Inhibitionsassays festgestellten Unterschiede zwischen K3 und K905:

- Die Antikörperpräparation K3 inhibiert die Laminin-Nidogen-Bindung besser als K905, weil sie durch eine schnellere Assoziationskinetik charakterisiert ist.
- Die Antikörperpräparation K3 inhibiert auch dann, wenn sie simultan mit dem Nidogen in den mit Laminin P1 beschichteten Röhrchen inkubiert wird, weil sie bei einer zum Nidogen vergleichbaren Konzentration eine gute Assoziationskinetik hat.
- Die Antikörperpräparation K905 kann nur in der Assayvariante "sequentielle Inhibition" inhibieren, weil sie durch eine langsame Dissoziationsrate charakterisiert ist und deshalb von dem später zugesetzten Nidogen nicht mehr so gut vom Antigen verdrängt werden kann. Bei einer gleichzeitigen Konkurrenz um die Bindungsstelle ist K905 aufgrund der sehr langsamen Assoziationskinetik dem Nidogen unterlegen.

Beispiel 9: Nachweis der Bindungsspezifitäten der affinitätsgereinigten Antikörperpräparationen K3 und K905 mittels Western Blot

In Western Blot-Analysen wurde die Interaktion der Antikörperpräparationen K3 und K905 mit dem Konjugat-2 und dem Ovalbumin untersucht. Hierzu wurden die Antigene mit Hilfe von 4-12% NuPAGE™ Gelen (NOVEX™, San Diego, CA) unter Zuhilfenahme eines MOPS-Puffers gemäß Instruktionsanleitung von NOVEX™ aufgetrennt und anschließend unter Verwendung von NuPAGE™ Transferpuffer (NOVEX™) auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran mit 1 µg/ml Polyvinylalkohol (1 min) wurden die Antigene mit den Testantikörpern inkubiert. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgte dann mit Hilfe von Anti-Kaninchen IgG-Antikörpern, an die das Enzym alkalische Phosphatase kovalent gebunden war.

Es zeigte sich, daß die affinitätsgereinigten Antikörper ausschließlich an das Peptid binden, denn eine Interaktion mit dem Trägerprotein Ovalbumin ist nicht

nachweisbar. Eine Reaktion mit den blaugefärbten Markern des "See Blue" Standards (NOVEX™) konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Weiterhin wurde nachgewiesen, daß sowohl K3 als auch K905 mit Laminin und Lamininderivaten unterschiedlicher Spezies (Laminin aus der humanen Plazenta sowie aus dem Dottersack der Ratte (Calbiochem), Laminin P1 aus der humanen Plazenta sowie dem EHS Tumor der Maus, rekombinant hergestelltes Maus-Laminin $\gamma 1$ III 3-5) reagieren. Dies belegt die Bindung der Antikörper an die konservierte Sequenz innerhalb der Nidogen-Bindungsdomäne. Beide Antikörperpräparationen zeigten keine Kreuzreaktivität zum humanen Nidogen und zum humanen Kollagen Typ IV. Dies ist die Voraussetzung für die eindeutige Verwendung der beschriebenen Antikörper als Nidogen-Antagonisten.

Beispiel 10: Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper werden geeignete Wirbeltiere, bevorzugt Mäuse oder Ratten, nach Standardverfahren z.B. mit Laminin, Laminin P1, Laminin $\gamma 1$ III 3-5, Laminin $\gamma 1$ III 4 oder mit den im Beispiel 2 aufgeführten Konjugaten immunisiert. Im Falle einer spezifischen Immunreaktion des Antiserums werden gemäß Standardverfahren MAK-produzierende Hybridome gewonnen.

Das Screening nach den gewünschten Antikörpern bzw. den entsprechenden Hybridoma-Klonen ermöglichen u.a. Bindungsassays (z.B. Dot Blot oder Western Blot mit Laminin $\gamma 1$ III 3-5 und/oder Laminin $\gamma 1$ III 4) sowie vor allem auch die im Beispiel 7 beschriebenen Inhibitionsassays. Die selektierten Klone stellen eine Quelle für die Synthese großer Mengen der erfindungsgemäßen Antikörper dar.

Zur Reinigung der gewünschten Antikörper können übliche Verfahren eingesetzt werden, wie z.B. die Bindung an Protein G oder A. Bevorzugt erfolgt jedoch eine Affinitätschromatographie an Laminin P1-Säulen. Dieser Reinigungsschritt erlaubt,

wie im Falle der weiter oben beschriebenen polyklonalen Antikörper, die Auswahl und selektive Anreicherung der monoklonalen Antikörper mit den besten Bindungskonstanten.

Ein Beispiel für einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung ist der monoklonale Antikörper (MAK), welcher von dem unter der Hinterlegungsnummer DSMACC2327 am 27. Oktober 1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Marscheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland) gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrags hinterlegten monoklonalen Zellklon A6/2/4 produziert wird.

Das Hybridom stammt aus einer Immunisierung von Mäusen mit Laminin P1, welches aus Humanplazenta isoliert worden war. Die Reinigung des Antigens, sowie die Erzeugung der Hybridome ist in der EP 0 696 597 A2 beschrieben.

Der Antikörper A6/2/4 wurde aufgrund seiner Bindungseigenschaften an Laminin γ 1 III 3-5 und Laminin γ 1 III 4 identifiziert. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper des IgM-Subtyps der durch Siebgelchromatographie gereinigt werden kann. Die Bindung zum Laminin P1 ist u.a. aufgrund der gegebenen Polyvalenz außerordentlich stark. Deshalb und aufgrund der Größe des IgM Antikörpers ist eine Elution von Laminin P1 Affinitätssäulen (s.o.) nicht zu erzielen. Die starke Bindung zum Laminin P1 spiegelt sich im Inhibitionsassay ("simultane Variante", s.o.) wider. Der MAK A6/2/4 ist in der Lage, die Laminin/Nidogen Assoziation mit einem IC50 von 30 nM zu inhibieren.

Aufgrund der ausgeprägten Konformationsabhängigkeit in seiner Bindung kann das Bindeepitop in der Laminin γ 1 III 4 Domäne (der Nidogen bindenden Domäne des Laminins) nicht eindeutig eingekränzt werden. Die Tatsache, daß Peptide, die aus der Nidogenbindungssequenz des Laminins abgeleitet werden können, die Wechselwirkung des Antikörpers mit Laminin P1 partiell (75-80 %) unterdrücken, deutet aber darauf hin, daß das Bindeepitop des MAK A6/2/4 mit dem des Nidogens überlappt.

Im folgenden wird die Herstellung von inhibitorischen, monoklonalen Antikörpern beschrieben die, wie die polyklonalen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, mit Hilfe des Peptid/Ovalbumin Konjugats erzeugt werden können.

Mäuse vom SJL/J - Stamm werden mit 50 µg Peptid-2/Ovalbumin Konjugat (Konjugat 2, s.o.) in Gegenwart von komplettem Freund'schen Adjuvans subcutan immunisiert. Nach 4 und 8 Wochen wird die Immunreaktion durch weitere subcutane Injektionen von je 25 µg Konjugat 2 in Gegenwart von inkomplettem Freund'schen Adjuvans verstärkt und sieben weitere Wochen gewartet. Drei Tage vor der Fusion wird die Immunantwort durch intraperitoneale Injektion von weiteren 25 µg Konjugat 2 verstärkt.

Zur Fusion werden die Tiere getötet und die Milzzellen isoliert. In Gegenwart von Polyethylenglycol werden die Milzzellen mit der Myeloma Zelllinie P3X63AG8.653 fusioniert. Durch Kultivierung der Fusionsmischung in Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium über einen Zeitraum von drei Wochen wird auf Milzzell x P3X63AG8.653-Hybride selektioniert. Zur Erreichung einer stabilen Zelllinie werden die erhaltenen Zellklone mehrfach subkloniert. Die entstehenden Zellkolonien werden in verschiedenen immunologischen Bindungstests auf Antikörperproduktion getestet. Die entstandenen Zelllinien E79/1/6 und E82/1/10 wurden aufgrund der unten stehenden Screeningstrategie selektioniert.

Versuche zur Charakterisierung und Identifizierung der spezifischen monoklonalen Antikörper.

Die Immunisierung von SJL/J - Mäusen mit Konjugat 2 führt zu einer außerordentlich großen Anzahl Antikörper produzierender Hybridomaklone. Die Antikörper im Kulturüberstand weisen eine starke Immunreaktion mit Laminin γ 1 III 3-5, Laminin P1 und Ovalbumin auf.

Um nun Klone zu finden die monoklonale Antikörper gegen die nativ strukturierte Nidogen Bindungsdomäne des Laminins produzieren, mußte ein geeignetes

Screeningverfahren durchgeführt werden.

Hauptaugenmerk bei diesem Screeningverfahren wird auf die Bindung der Antikörper an Laminin P1 und Laminin $\gamma 1$ III 3-5 gelenkt. Gleichzeitig muß im Zuge der Subklonierungen darauf geachtet werden, daß die Reaktion mit dem Trägerprotein, Ovalbumin, vernachlässigbar wird und Antikörper die ausschließlich Ovalbumin erkennen aussortiert werden.

In den Tabellen 3 und 4 sind die Ergebnisse dargestellt, die mit zwei derart identifizierten Klonen (E79 und E82) erzielt werden.

Tabelle 3: Bestimmung der Bindung von E79 im ELISA

	Laminin $\gamma 1$ III 3-5, Beschichtung: 2,5 $\mu\text{g/ml}$	Laminin P1 Beschichtung: 2,0 $\mu\text{g/ml}$	Ovalbumin Beschichtung: 20 $\mu\text{g/ml}$
Hybridom E79 unverdünnter Kulturüberstand	1,33	0,68	1,63
E79/1/6, 1. Klonierung unverdünnter Kulturüberstand	2,03	0,16	0,27
E79/1/6, gereinigter Antikörper 2,5 $\mu\text{g/ml}$	0,56	0,33	0,05

Tabelle 4: Bestimmung der Bindung von E82 im ELISA

	Laminin γ1 III 3-5, Beschichtung: 2,5 µg/ml	Laminin P1 Beschichtung: 2,0 µg/ml	Ovalbumin Beschichtung: 20 µg/ml
Hybridom E82 unverdünnter Kulturüberstand	1,77	1,48	2,33
E82/1/10, 1. Klonierung unverdünnter Kulturüberstand	1,32	0,26	0,05
E82/1/10, gereinigter Antikörper 6,4 µg/ml	1,55	0,5	0,18

Durch die Klonierung ist es offensichtlich gelungen, Zellen abzutrennen, die eine Immunreaktion mit Ovalbumin zeigen. Gleichzeitig konnte jeweils ein Zellklon separiert werden, der Antikörper produziert der eine Bindung zu Laminin γ1 III 3-5 und Laminin P1 zeigt. Diese Tatsache und die Tatsache, daß die Immunisierung mit einem Peptid erfolgte, das aus der Nidogen Bindungsdomäne des Laminins abgeleitet ist, belegt, daß die gefundenen Antikörper an das nativ strukturierte Nidogen Bindungsmotif des Laminins binden.

Den direkten Beweis für die Bindungsspezifität liefert die "simultane" Variante des Inhibitionsassays (s.o.), in dem die gefundenen Antikörper direkt mit jodiertem Nidogen um die Bindung an das Nidogen Bindungsmotif des intakten Laminins (Laminin aus Maus EHS Tumor, Chemicon, Nr. CC095) konkurrieren.

Der von Zellklon E79/1/6 gebildete Antikörper (IgG2a - Subtyp) inhibiert die Laminin - Nidogen Assoziation mit einem IC50 von 19 nM, der von Zellklon E82/1/10 gebildete Antikörper (IgG1 - Subtyp) inhibiert die Laminin - Nidogen Assoziation mit einem IC50 von 190 nM.

Patentansprüche

1. Antikörper oder Teil desselben, dadurch gekennzeichnet, daß er an die Nidogenbindungsdomäne $\gamma 1$ III-4 des Laminins bindet.
2. Antikörper oder Teil desselben nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er an den hochkonservierten Bereich des Loops a bzw. der Loops a und c der Nidogenbindungsdomäne $\gamma 1$ III-4 des Laminins oder in unmittelbarer Nähe dieser Loops bindet.
3. Antikörper oder Teil desselben nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er in bezug auf das Epitop konformationsabhängig direkt oder überlappend an den hochkonservierten Bereich des Loops a bzw. der Loops a und c bindet.
4. Antikörper oder Teil desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens an ein Peptid gemäß Tabelle 1 bindet.
5. Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er polyklonal ist.
6. Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
7. Antikörper nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es ein chimärer, humanisierter, bi- oder oligospezifischer Antikörper ist.
8. Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß er die Laminin-Nidogen-Bindung kompetitiv oder partiell kompetitiv inhibiert.

9. Antikörper, erhältlich durch Immunisierung immunkompetenter Wirbeltiere mit Laminin oder Laminin P1 als Immunisierungsantigen und nachfolgender Identifizierung des Antikörpers mittels Laminin γ 1 III-3-5 und/oder Laminin 1 III-4 und Prüfung desselben auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung.
10. Antikörper, erhältlich durch Immunisierung immunkompetenter Wirbeltiere mit Laminin γ 1 III-3-5 als Immunisierungsantigen, nachfolgender Identifizierung des Antikörpers mittels Laminin und/oder Laminin P1 und Prüfung desselben auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung.
11. Antikörper, erhältlich durch Immunisierung immunkompetenter Wirbeltiere mit Laminin γ 1 III-4 und/oder mit Peptiden, die wesentliche Anteile der Nidogenbindungsstellen enthalten, aber nicht die vollständige Aminosäuresequenz der Laminin γ 1 III-4-Domäne, als Immunisierungsantigen.
12. Antikörper nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß Laminin γ 1 III-4 als Immunisierungsantigen eingesetzt wird.
13. Antikörper nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß eines der oder beide Peptide gemäß Tabelle 1 als Immunisierungsantigen eingesetzt werden.
14. Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet daß der Antikörper mittels Laminin und/oder Laminin P1 identifiziert wird.
15. Antikörper nach einem oder mehreren der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet daß der Antikörper auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft wird.

16. Antikörper nach einem der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß monoklonale Antikörper produzierende Hybridoma-Zellen erzeugt werden.
17. Antikörper nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß er aus Antikörper enthaltendem Material durch Affinitätschromatographie gereinigt wird.
18. Antikörper nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätschromatographie an Laminin und/oder Laminin P1 als Affinitätsmatrix erfolgt.
19. Zelle oder Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß diese einen Antikörper oder Teile desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 produziert.
20. Hybridom DSMACC2327.
21. Antikörper, produziert von dem Hybridom DSMACC2327.
22. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß immunkompetente Wirbeltiere mit Laminin oder Laminin P1 immunisiert werden, der Antikörper mittels Laminin $\gamma 1$ III-3-5 und/oder Laminin $\gamma 1$ III-4 identifiziert und derselbe auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft wird.
23. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß immunkompetente Wirbeltiere mit Laminin $\gamma 1$ III-3-5 immunisiert werden, der Antikörper mittels Laminin und/oder Laminin P1 identifiziert und derselbe auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft wird.

24. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß immunkompetente Wirbeltiere mit Laminin γ 1 III-4 und/oder mit Peptiden, die wesentliche Anteile der Nidogenbindungsstellen enthalten, aber nicht die vollständige Aminosäuresequenz der Laminin γ 1 III-4-Domäne, immunisiert werden.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß Laminin γ 1 III-4 als Immunisierungsantigen eingesetzt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß eines der oder beide Peptide gemäß Tabelle 1 als Immunisierungsantigen eingesetzt werden.
27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Immunisierungsantigen an einen Träger gekoppelt ist.
28. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet daß der Antikörper mittels Laminin und/oder Laminin P1 identifiziert wird.
29. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet daß der Antikörper auf kompetitive oder partiell kompetitive Inhibierung der Laminin-Nidogen-Bindung geprüft wird.
30. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß monoklonale Antikörper produzierende Hybridoma-Zellen erzeugt werden.
31. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper aus Antikörper enthaltendem Material durch Affinitätschromatographie gereinigt wird.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätschromatographie an Laminin und/oder Laminin P1 als Affinitätsmatrix erfolgt.
33. Antikörper oder Teil desselben gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 oder 21, zur Verwendung als Arzneimittel.
34. Arzneimittel enthaltend einen oder mehrere Antikörper oder Antikörperteile gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 und 21.
35. Verwendung eines oder mehrerer Antikörper oder Antikörperteile gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 und 21 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten, die durch eine vermehrte oder unerwünschte Synthese von Basalmembranen charakterisiert sind.
36. Verwendung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Krankheit eine Form von diabetischen Spätkomplikationen, die von Verdickungen der Basalmembran begleitet sind, eine Form der Arteriosklerose, eine Fibrose, oder eine Krankheit ist, bei der eine Angiogenese zur Verschlechterung des klinischen Bildes beiträgt.
37. Verwendung nach Anspruch 35 oder 36 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der diabetischen Retinopathie, der alkoholischen Leberfibrose, der Lungenfibrose, einer Krebserkrankung, der diabetischen Nephropathie oder einer Erkrankung mit einer starken entzündlichen Komponente wie z.B. rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, Vaskulitis, Haemangiome und Psoriasis.
38. Antikörper oder Teil desselben gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 oder 21 zur Verwendung als Diagnostikum.

39. Diagnostikum enthaltend einen oder mehrere Antikörper oder Antikörperteile gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 und 21.
40. Verwendung eines oder mehrerer Antikörper oder Antikörperteile gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18 und 21 zur Herstellung eines Diagnostikums zum Nachweis von γ 1-enthaltenen Lamininisoformen in biologischen Proben, Körperflüssigkeiten oder in Geweben.
41. Verwendung eines Antikörpers oder eines Teils desselben gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18 oder 21 als Hilfsmittel in biologischen und pharmakologischen Modellen zur Entwicklung und Bewertung von die Laminin/Nidogen-Interaktion beeinflussenden Stoffen.
42. Verwendung nach Anspruch 41 in einem biologischen und pharmakologischen Modell zur Entwicklung und Bewertung von die Laminin/Nidogen-Interaktion beeinflussenden Stoffen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/07241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ : C07K16/18 C07K16/46 C12N5/20 A61K39/00 A61K39/395 G01N33/68
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC G01N33/577

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶ : C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>EKBLOM P. ET AL.: "Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro" DEVELOPMENT, Bd. 120, Nr. 7, 1994, Pages 2003-2014, XP002065847 cited in the application see abstract see page 2004, column 1, paragraph 3- paragraph 4 see page 2007, column 1, paragraph 2- column 2, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-18, 22-25, 28-32, 38-42</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

• Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 May 1998 (29.05.98)

Date of mailing of the international search report

24 June 1998 (24.06.98)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/07241

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MAYER U. ET AL.: "A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding" THE EMBO JOURNAL, Bd. 12, Nr. 5, 1993, pages 1879-1885, XP002065848 cited in the application see abstract</p>	<p>1-18, 22-25, 28-32, 38-42</p>
Y	<p>--- US 5 211 657 A (YAMADA Y, SASAKI M, KLEINMAN HK, MARTIN GR)</p> <p>title see column 3, line 13 - column 4, line 2 see claim 15</p> <p>---</p>	<p>1-14, 22-28, 33,34, 38-42</p>
Y	<p>US 5 493 008 A (FOX JW, TIMPL R)</p> <p>20 February 1996 (20.02.96) cited in the Application</p> <p>see column 2, line 32 - line 45 see column 3, line 60-62 see column 6, line 36-38 see column 10, line 1 - line 35 see claim 12</p>	<p>1-14, 22-28, 33,34, 38-42</p>
A	<p>--- EP 0 696 597 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT)</p> <p>14 February 1996 (14.02.96) cited in the Application</p> <p>see page 3, line 11 - line 31 see page 5, line 16 - line 20 see page 7, line 27 - line 29 see claim 21</p> <p>-----</p>	<p>1-5, 9-12,14, 16-25, 28, 30-32, 38-40</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP97/07241

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims 41, 42(all said Claims, in so far as they deal with an in vivo method) relate to a diagnostic method which is performed on the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/07241

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5211657 A	18-05-1993	AU 631823 B	10-12-1992
		AU 4626489 A	12-06-1990
		CA 2002352 A	07-05-1990
		EP 0441882 A	21-08-1991
		JP 3505212 T	14-11-1991
		WO 9005741 A	31-05-1990

US 5493008 A	20-02-1996	AU 3235895 A	07-03-1996
		CA 2196053 A	22-02-1996
		EP 0771210 A	07-05-1997
		JP 10504306 T	28-04-1998
		WO 9604926 A	22-02-1996

EP 0696597 A	14-02-1996	CA 2155793 A	12-02-1996
		JP 8231596 A	10-09-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/07241

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K16/18 C07K16/46 C12N5/20 A61K39/00 A61K39/395
G01N33/68 G01N33/577

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>EKBLOM P. ET AL.: "Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro" DEVELOPMENT, Bd. 120, Nr. 7, 1994, Seiten 2003-2014, XP002065847 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 2004, Spalte 1, Absatz 3 - Absatz 4 siehe Seite 2007, Spalte 1, Absatz 2 - Spalte 2, Absatz 1</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1-18, 22-25, 28-32, 38-42</p>



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Mai 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24.06.1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Covone, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MAYER U. ET AL.: "A single EGF-like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding" THE EMBO JOURNAL, Bd. 12, Nr. 5, 1993, Seiten 1879-1885, XP002065848 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-18, 22-25, 28-32, 38-42
Y	US 5 211 657 A (YAMADA Y, SASAKI M, KLEINMAN HK, MARTIN GR) 18.Mai 1993 *titel* siehe Spalte 3, Zeile 13 - Spalte 4, Zeile 2 siehe Anspruch 15 ---	1-14, 22-28, 33,34, 38-42
Y	US 5 493 008 A (FOX JW, TIMPL R) 20.Februar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 2, Zeile 32 - Zeile 45 siehe Spalte 3, Zeile 60-62 siehe Spalte 6, Zeile 36-38 siehe Spalte 10, Zeile 1 - Zeile 35 siehe Anspruch 12 ---	1-14, 22-28, 33,34, 38-42
A	EP 0 696 597 A (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 14.Februar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 3, Zeile 11 - Zeile 31 siehe Seite 5, Zeile 16 - Zeile 20 siehe Seite 7, Zeile 27 - Zeile 29 siehe Anspruch 21 -----	1-5, 9-12,14, 16-25, 28, 30-32, 38-40

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 41, 42 (alle, soweit sich um ein in vivo Verfahren handelt) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Paténtfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/07241

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5211657 A	18-05-1993	AU 631823 B	10-12-1992
		AU 4626489 A	12-06-1990
		CA 2002352 A	07-05-1990
		EP 0441882 A	21-08-1991
		JP 3505212 T	14-11-1991
		WO 9005741 A	31-05-1990
US 5493008 A	20-02-1996	AU 3235895 A	07-03-1996
		CA 2196053 A	22-02-1996
		EP 0771210 A	07-05-1997
		JP 10504306 T	28-04-1998
		WO 9604926 A	22-02-1996
EP 0696597 A	14-02-1996	CA 2155793 A	12-02-1996
		JP 8231596 A	10-09-1996

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.